

## 諸言

ビスフェノール A (2,2-bis[4-hydroxyphenyl]propane, BPA) は、弱いエストロゲン活性を示す内分泌かく乱物質としてよく知られており、ポリカーボネートプラスチックやエポキシ樹脂製品の原料として、缶詰の内側のコーティングや歯科用のシーラント等に広く使われている[38, 39, 47]。しかし、pH の変化や熱によって容易に食品や飲料品中に溶出すると言われており[23]、これが体内に入る主な要因と考えられている。BPA は生殖器系や神経系等への影響が報告されており、糖代謝異常や、乳癌、社会性行動の異常にも関わっていると言われており[7]。

BPA はラットにおいて、uridine diphosphate (UDP) -glucuronosyltransferase の分子種の一つである UGT2B1 によってグルクロン酸抱合され、BPA グルクロン酸抱合体 (BPA-GA) となり、速やかに体外へ排出される[50]。血漿中に含まれる BPA のうち、抱合されていない BPA の状態のものは 2%にすぎず、0.02ng/mL 以下であるという報告もある[46]。この様な高い排出機構があるにも関わらず、特に妊娠期の BPA 暴露による胎仔の発達や、さらには二次性徴期の発達にまで影響があるという報告がある[15, 49]。肝臓で代謝された BPA は BPA-GA となり、抱合体の輸送体である multidrug-resistance protein 2 (MRP2) によって主に胆汁中に排泄される[18]。しかしながら妊娠期には、MRP2 の発現量が減少し、代償的に静脈中に排出される BPA-GA が増加する[17]。この母体血中の BPA-GA 濃度上昇は、胎盤を介した胎仔暴露のリスクを高めることになっている。当研究室の BPA-GA の子宮灌流実験により、生体への活性はないとされる BPA-GA が胎盤を通過し、胎仔において BPA へ脱抱合されていることがわかった[37]。またヒトの妊娠中期、後期の羊水中や臍帯から BPA が検出されている[16]。そして胎仔期における肝臓の UGT2B1 の発現量は低く[37]、胎仔の BPA 代謝能力は極めて低いと言える。つまり、これまで速やかに生体活性のない BPA-GA へ代謝され、体外へ排出されると考えられてきた BPA は、妊娠中に BPA-GA として胎盤を通過し、代謝能力の低い胎仔で BPA として影響を及ぼしていると考えられるのである (図 1)。

近年、低用量の BPA が胎児や乳幼児に影響を与えるという報告をうけ、世界的に BPA のヒトへの影響について再評価が行われ、胎児・乳幼児期における暴露に関しての規制が強くなっている。日本では現在、耐容一日摂取量を 0.05mg/kg/日としており、それに基づき溶出試験規格を 2.5µg/mL としている。厚生労働省は BPA の暴露をできる限り減らすために、関係事業者に製品の改良等自主的取組をさらに推進していくよう要請している。カナダや EU では、それぞれ 2010 年と 2011 年に BPA を含むポリカーボネート性哺乳瓶の製造を禁止している[51, 53]。このような動きを受け、BPA に代わるビスフェノール類の使用が広まってきている。ビスフェノール B (2,2-bis(4-hydroxyphenyl)butane, BPB) や、ビスフェノール F (bis(4-hydroxyphenyl) methane),BPF)、ビスフェノール AF (4,4-hexafluoroisopropylidene)diphenol, BPAF)、ビ

スフェノール S (bis(4-hydroxyphenyl)sulfone, BPS) などが挙げられる[42]。これらは現在、規制されることなく使用されているが、その構造が BPA と似ており、ヒトに同じような影響を及ぼすのではないかと懸念されている。また、すでに飲料や缶詰食品、家の埃、ヒトの血清、ヒトの尿等からの検出が報告されている[6, 29, 30]。しかしながらその毒性評価はいまだに不十分であり、特に BPA で懸念されている次世代影響についての評価は急務であると考えられる。本研究では、第 I 章で BPF、BPAF の胎仔および新生仔における代謝活性および、UGT2B1 の発現量の比較を行った。第 II 章では、BPF について妊娠期・非妊娠期の肝臓から胆汁中または静脈中への代謝物の排出について比較検証を行った。

また胎盤を通過した BPA の胎仔での動態および毒性発現機序はいまだ不明なままである。胎仔、新生仔において腸管内での  $\beta$ -グルクロニターゼ活性が高く、脱抱合され腸肝循環しやすいとされること、多くの報告で羊水中から BPA が検出されていることから、胎盤を通過した BPA-GA が胎仔腸管内で BPA へ脱抱合されているのではないかとこの仮説を立てた。第 III 章では胎仔腸管を使った灌流実験により、BPA-GA の腸管内での脱抱合および腸組織における  $\beta$ -グルクロニターゼの局在について検証を行った。

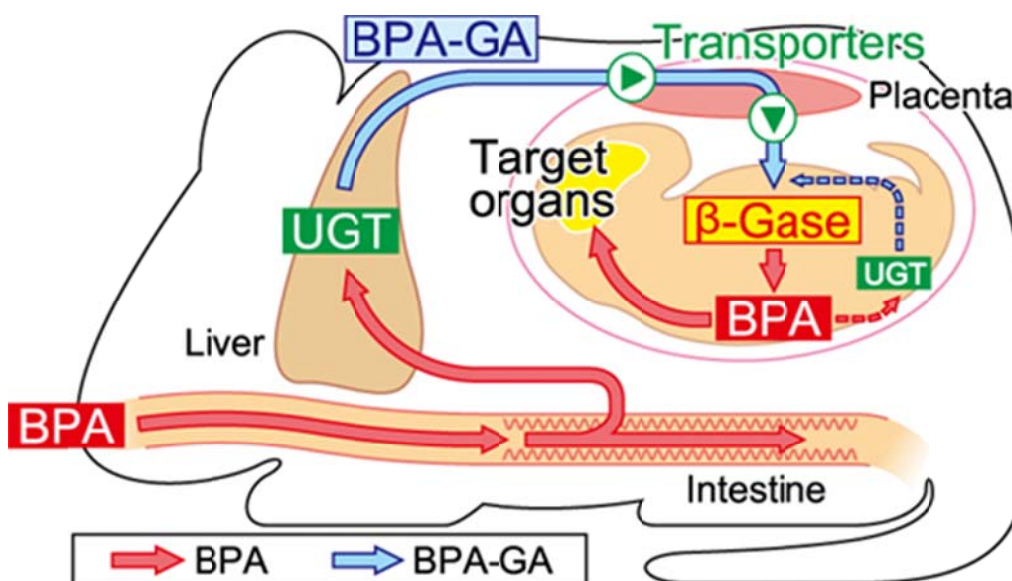


図 1 妊娠期低用量 BPA 曝露による胎仔影響メカニズムの概略図

## 第 I 章 妊娠後期から乳幼仔におけるビスフェノール類の代謝動態

### 1. 序文

薬物や様々な生体外物質を体外に排出するために、生体では主に肝臓において生体異物の親水性を高め、排出しやすい形に代謝する機構が備わっている。代謝は多くの場合、2つの相で起こり、第 I 相反応では CytochromeP450 (CYP) による水酸基の付加が代表的である。第 II 相反応では抱合反応が行われ、グルクロン酸抱合、硫酸抱合、アセチル化などがあげられ、第 I 相反応よりも水溶性が高まり排泄されやすくなる。

BPA についても同様の代謝を受けることがわかっており、ラットの肝臓において、BPA は UDP-glucuronosyltransferase (UGT) の分子種である UGT2B1 を介して BPA-GA となり、速やかに体外へ排泄される[50]。しかしながら、胎仔では肝臓の UGT2B1 の発現量が低く、BPA を体外へ排出する機能が大変弱い[37]。

近年、特に BPA の胎児・乳幼児期における暴露に関する規制が強くなっている。2010 年にカナダ政府は BPA を含むポリカーボネート性哺乳瓶の輸入や販売・広告を禁止し[53]、2011 年に EU が哺乳瓶の製造にポリカーボネートの使用を禁止した[51]。そして 2015 年にフランス政府は全ての食品包装において BPA の使用を禁止した[55]。そのため BPF や BPAF 等の BPA の類似物が BPA の代替物質として使用されることが多くなってきている。しかしながら、BPA の類似物はその構造が BPA と似ているために、BPA と同じような影響が懸念されている。BPF や BPAF は弱いエストロゲン活性が認められており、歯科材料[13]や缶詰食品[29]、住宅の埃[30]などから検出されている。BPAF はエストロゲン受容体 (ER) に結合することでエストロゲン様作用を起こしており[27, 28]、ER $\alpha$  にアゴニスト活性が認められ、ER $\beta$  にはアンタゴニスト活性が認められている[34]。また、BPAF はヒトのプレグナン X 受容体のアゴニストとしても報告されている[45]。BPF は ER に親和性を示し、抗アンドロゲン活性があり、BPA とは少し異なる[28,42]。BPF、BPAF はヒトやラットの肝臓の UGT で代謝され[9]、BPF はラットにおいて妊娠後期に胎盤を通過することが報告されている[2]。BPA は次世代への影響について数多くの報告がされているが、BPA の類似物質による次世代影響については未だほとんど報告されていない。私達は胎児や乳幼児期の UGT 活性が低いことが影響のメカニズムの一つの要因となると仮定し、胎仔と乳幼仔、母親のマウスの肝臓における BPA と BPF、BPAF に対する UGT 活性を調査し、さらに UGT2B1 の発現量の比較を行った。

## 2. 材料と方法

### 1) 試薬

BPA、BPF、BPAF および high liquid performance chromatography (HPLC) 適合規格のメタノールは関東化学（東京）より購入した。その他一般試薬は、純度の高い物を用いた。

### 2) 共試動物

10 週齢の妊娠期および乳幼仔 C57BL/6 マウスは三協ラボサービス（東京）より購入した。いずれも自由採食、自由採水とし室温 22°C±2°C、12 時間明 - 12 時間暗サイクルの条件下で個別に飼育した。全ての動物実験はペントバルビタール（ソムノペンチル、共立製薬、東京）による麻酔下で実施し、酪農学園大学動物実験委員会から承認を受けて行なった (ES23A07)。

### 3) ビスフェノール類のグルクロン酸抱合体の分離・精製

#### 3)-a. 肝灌流外科手順

ラットを用いた BPA、BPF、BPAF の肝灌流によって BPA-GA、BPF グルクロン酸抱合体 (BPF-GA)、BPAF グルクロン酸抱合体 (BPAF-GA) をそれぞれ分離・精製した。灌流液にはクレブス・リンガーバッファー (115 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM グルコース) を用い、pH を 7.4 に調製して 95%O<sub>2</sub> と 5%CO<sub>2</sub> でエアレーションを行い、37°C に保温して使用した。生後 10 週齢の雄ラットにペントバルビタール (8.46mg/100g 体重) を腹腔内投与し、麻酔の条件下で手術を行った。腹壁を切開し、肝臓、門脈、胆管、後大静脈を露出した。総胆管と門脈にはそれぞれ PE-10 と PE-50 ポリエチレンチューブを挿管し、門脈経由でクレブス・リンガーバッファーを灌流した。灌流開始後速やかに腹腔大静脈を切開し、内径 2mm、外径 3mm のポリエチレンチューブを挿入して排液した。胸腔を切開し、胸大静脈を結索した (図 2)。

#### 3)-b. 肝灌流

ビスフェノール類の基質液 (7.5μM BPA、BPF、BPAF/ クレブス・リンガーバッファー) を調製し、灌流液と同様にエアレーションを行い 37°C に保持した。灌流システムは図 2 に示すようにポンプ (MP-32N、東京理化工機、東京) とチューブで構築した。流速 30ml/min で灌流を行い、灌流液による 15 分間の予備灌流の後、BPA 基質液を 5 分間灌流し、その後再び灌流液を 55 分間灌流した (灌流時間 ; 計 60 分間)。基質液灌流開始後、胆汁を 60 分間回収し、液体窒素で凍結の後、-80°C で保存した。

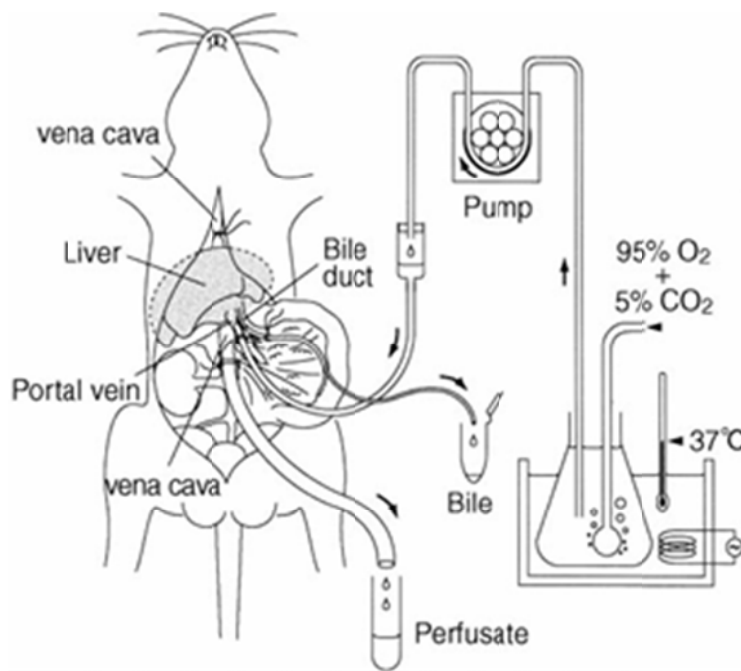


図2 肝灌流概略図

### 3)-c. ビスフェノール類のグルクロン酸抱合体の分離・精製

肝灌流によって回収した胆汁は HPLC（島津、東京）でビスフェノール類のグルクロン酸抱合体を分離し、 $\beta$ -グルクロニターゼ処理したものと、処理しないものとを比較することで定量した。凍結乾燥機（EYELA model FDU-2100、東京理化学器械）で乾燥し、最終濃度が  $650\mu\text{M}$  となるように蒸留水に溶解した。得られた BPA-GA 溶液は liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry (LC/Tof-MS) で BPA-GA、BPF-GA、BPAF-GA を同定し、BPA、BPF、BPAF が混入していないことを確認した。

### 4) 酵素活性解析

母体、胎仔、乳幼仔マウスから採取した肝臓は酵素活性解析用と遺伝子発現解析用に分けた。酵素解析用に採取された肝臓は  $1\text{mM}$  EDTA を含んだ 4 倍量の  $0.15\text{M}$  KCl でホモジナイズした。ホモジネートを  $9,000\text{g}$  30min 遠心し、上清を  $105,000\text{g}$  で 60 分間遠心し、マイクロゾーム画分を抽出した。抽出したマイクロゾームは解析まで  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。精製したマイクロゾームは  $0.01\%$  のコール酸ナトリウムを加えて  $0^\circ\text{C}$  30 分間インキュベートし活性化した。 $0.1\text{M}$  Trish-HCl バッファー ( $\text{pH}7.4$ )  $400\mu\text{l}$  に活性化マイクロゾーム  $10\text{mg}$ 、 $5\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $0.2\text{mM}$  BPA、および  $3\text{mM}$  の UDP グルクロン酸を加え、 $37^\circ\text{C}$  で 30 分間インキュベートした。反応液を 5 分間煮沸し、 $12,000\text{g}$  で 5 分間遠心後、上清をフィルター (HLC-DISK3、関東化学) 処理し、HPLC（東ソー）で解析した。

## 5) HPLC および LC/TOF-MS 解析

HPLC システム (東ソー) はデュアルポンプ (DP-8020)、蛍光検出器 (FS-8020)、カラムオーブン (CO-8020) で構成した。サンプルは逆相カラム (2.0 mm i.d. x 150 mm、Unison UK-C18、インタクト、東京) を用い、流速は 1.0ml/min とし、40°C、20 分間で溶液 A (メタノール : 水 = 24/76 vol/vol、10mM 酢酸アンモニウム、pH=7.0) と溶液 B (メタノール) のリニアグラジエントをかけて分離した。グルクロン酸抱合体は励起波長を 275nm、放出波長を 308nm で検出した。結果は LC-8020 ソフトウェア (東ソー) に記録した。ビスフェノールとその抱合体の検出ピークと標準液の検出ピークにおける相対面積を比較して濃度を算出した。検出限界は 0.2  $\mu$ M であった。

LC/ TOF -MS は上記の HPLC システムと LCT premier XE (Waters、Milford、USA) を用いた。HPLC の流速は 0.2ml/min とし、IC-3100 シリンジポンプ (松浦製作所、東京) を使った。

## 6) 定量的 reverse transcription PCR (RT-PCR)

遺伝子発現解析用に採取した肝臓は、4°Cで一晩 RNA later (Qiagen、Heidelberg、Germany) に浸漬後、-80°Cに保存した。RNeasy Mini Kit と RNase-free DNase (Qiagen) を用いて RNA を抽出した。RNA は ReverTra Ace (東洋紡、大阪) と Oligo dT primers (東洋紡) を用いて cDNA に変換した。PCR 試薬には Quanti Tect SYBR Green PCR kit (Qiagen) を使用し、iQ5/MyiQ Single-Color (Bio-Rad Laboratories、Hercules、USA) により解析した。Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現を内部標準として発現量を補正した。解析に用いた組織数はそれぞれ n = 3 とした。値は mean  $\pm$  SE で示した。発現解析に用いたオリゴヌクレオチドプライマーの配列は、表 1 に示した。これらのプライマーは GenBank の DNA 塩基配列を使い設計した。PCR 反応は 94°C30 秒、64°C30 秒、72°C60 秒を 1 サイクルとし、35 サイクル行った。それぞれのターゲット遺伝子の増幅断片は pSTBlue-1 Acceptor Vector (MERCK MILLIPORE、Billerica、USA) へサブクローニングされ、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  株 を用いて形質転換を行った。それぞれの遺伝子配列を含むプラスミドベクターは分光光度計を使い定量され、スタンダードカーブは遺伝子のテンプレートを 100 または 10 倍ごとに段階希釈し、用いた (10<sup>8</sup>-10<sup>2</sup> copies)。

## 7) 統計分析

全てのデータは 平均  $\pm$  S.E. で示し、分散分析 (ANOVA) で比較し、P<0.05 のものについて Fisher の PLSD で検証した (P<0.05)。

表 1 UGT 分子種の発現解析に用いたプライマーの塩基配列

| Primer   | Nucleotide sequence              |
|----------|----------------------------------|
| UGT2B1-F | 5'- AGATGATGGGGAAGGCAGAT-3'      |
| UGT2B1-R | 5'- GCAAGAGCAGAAGCAACTAC-3'      |
| UGT1A6-F | 5'-CCTCAGTGAACGCGGACACGAC-3',    |
| UGT1A6-R | 5'- TTCCTGTACTCTCTTAGAGGAGCCA-3' |
| GAPDH-F  | 5'-TTCAACGGCACAGTCAAG-3'         |
| GAPDH-R  | 5'-CACACCCATCACAAACAT-3'         |

### 3. 結果

#### 1) BPA、BPF、BPAF の UGT 活性

胎仔と乳幼仔、母親のマウスを用いて、肝臓のミクロソームにおける BPA と BPF、BPAF に対する UGT 活性を検証した (図 3)。性差による酵素活性の違いは認められなかった。胎仔と乳幼仔、母親全てにおいて、BPAF に対する UGT 活性は BPA や BPF に比べて 0.6~31%と低かった。さらに、21 日齢までに母親と同じレベルにまで酵素活性が増加しなかった。BPF、BPA に対する UGT 活性は、胎仔期や 7 日齢までは母親と比較すると 8~43%と低く、14 日齢あるいは 21 日齢には母親と同じレベルにまで増加した。

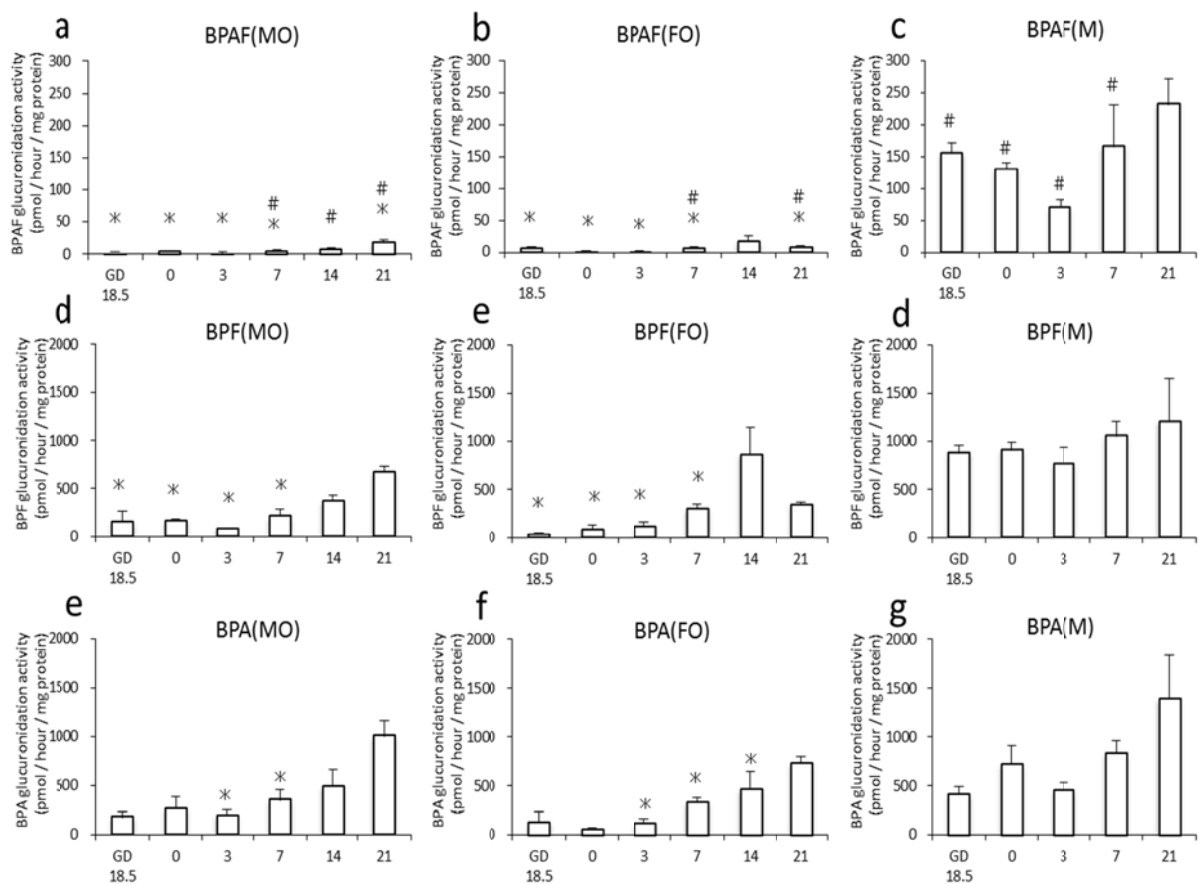


図3 周産期マウス肝臓における BPAF、BPF、BPA の UGT 活性

胎仔 (胎齢 18.5 日) および乳幼仔 (0 から 21 日齢) のオス (MO: a, d, g)、メス (FO: b, e, h)、また母親 (M: c, f, i) における BPAF (a, b, c)、BPF (d, e, f)、BPA (g, h, i) の UGT 活性について示している。値は mean±SE で示した (n=3)。\*は、それぞれの基質に対する活性が、同じ日齢の親と比較して有意に低いものを示している。また、#は、各日齢において、BPA や BPF より BPAF の活性が有意に低いものを示している (P<0.05)。

## 2) *UGT2B1*、*UGT1A6* の遺伝子発現量の比較

定量的 RT-PCR により、胎仔、乳幼仔、母親のマウス肝臓 *UGT2B1*、*UGT1A6* の遺伝子発現量の比較を行った (図 4)。性差による *UGT2B1*、*UGT1A6* の遺伝子発現量の違いは認められなかった。胎仔、乳幼仔の *UGT2B1* の発現量は母親と比較すると低く (母親の活性の 5.5%以下)、3 日齢から遺伝子発現が上がり始め (母親の半分レベル) 7 日齢になると母親と同じレベルに増加した (図 4, A)。母親の *UGT2B1*、*UGT1A6* の遺伝子発現量は産後 7 日において、仔よりも低い値を示した。一方で、胎仔、乳幼仔の *UGT1A6* の遺伝子発現量は、母親に比べて半分くらいの発現量で、3 日齢からはほぼ母親と同レベルの発現量となった (図 4, B)。



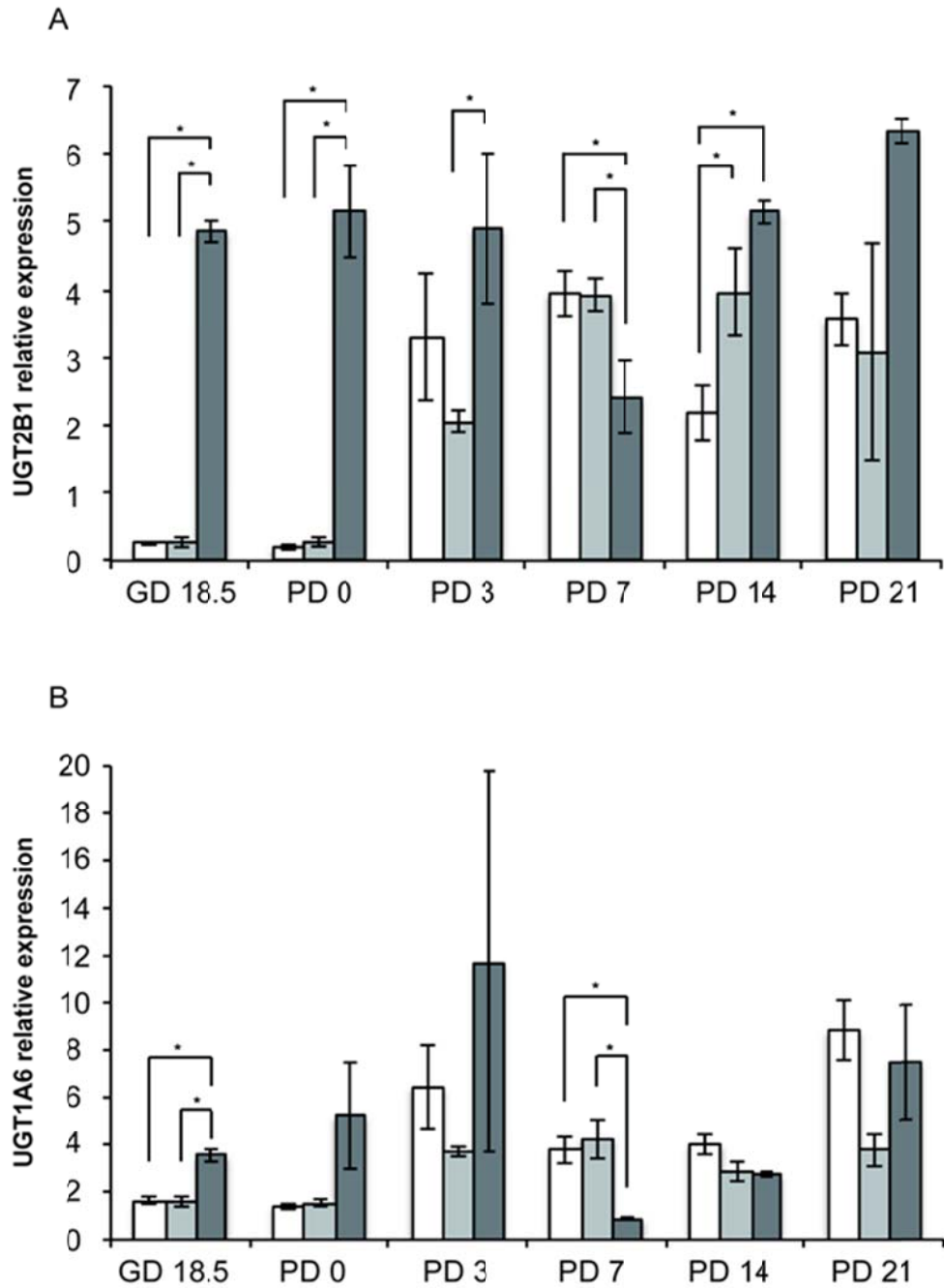


図4 *UGT2B1*、*UGT1A6*の遺伝子発現量の定量的解析

胎仔（胎齢 18.5 日）および乳幼仔（0 から 21 日齢）のオス（白）、メス（淡灰）、また母親（濃灰）の肝臓における *UGT2B1* (A)、*UGT1A6* (B) の mRNA 発現量を示している。*UGT2B1*、*UGT1A6*の定量解析は *GAPDH*の発現量を内部標準として補正した。値は mean±SE で示した (n=4)。\*は、それぞれの日齢で、母親と比べて発現量が有意に低いものを示している。

#### 4. 考察

UGT はビリルビンやステロイド、環境汚染物質などの、内因性および外因性物質を抱合し、親水性を高めて体外へ排出しやすい形にする[31, 32]。UGT1A1 は主にビリルビンのグルクロン酸化を触媒し、UGT1A1 の欠損は Crigler-Najjar 病となる[19]。UGT1A6 や UGT1A7 は、フェノールや benzo[a]pyrene などをグルクロン酸抱合する[31]。そして UGT2B1 はエストロゲンやモルヒネなどの様々な外因性・内因性のステロイドをグルクロン酸抱合する[31]。

以前、当研究室で BPA はラット肝臓において主に UGT2B1 によってグルクロン酸抱合されることを報告した[17, 18, 50]。また、BPA-GA 子宮灌流実験によって、BPA-GA が胎仔へ移行することや、灌流後の胎仔・羊水において BPA-GA のみならず、脱抱合された BPA までも検出されることが認められた[37]。周産期におけるビスフェノール類の薬物動態の解明は、次世代影響のメカニズムを解明するために重要なポイントとなると考えられる。

BPAF は SD ラットにおいて、主にグルクロン酸抱合体 (BPAF-GA) に代謝され、ヒトでは主に UGT2B7 で代謝されることが報告されており[26]、UGT2B7 はヒトの胎児肝臓での発現は低い[21]。UGT2B7 はラットの UGT2B1 の相同分子種として知られており[31]、UGT2B1 もまたラットの胎仔・乳幼仔期での発現は低い[31, 34]。近年、BPAF の毒性に関する報告があり、BPAF は *in vitro* においてエストロゲン作用を示すことがわかっている[27, 28]。一方で、ER $\alpha$  に対してはアゴニスト作用を示し、ER $\beta$  にはアンタゴニスト作用を示すことが報告されている[33]。BPAF はヒトプレグナン X 受容体のアゴニストであるという報告がある[45]。BPAF の暴露は、視床下部-下垂体-性腺軸や肝臓におけるホルモンバランス、遺伝子発現を乱し、ゼブラフィッシュ[42, 49]やラット[11]において、精子の劣化により、卵の授精を減少させると言われている。BPAF は BPA の安全な代替物質とされていたが、毒性が高いことが考えられ、これは特に本研究で示したように、周産期における BPAF の極めて低い代謝に関係している可能性がある。

一方 BPF に対する肝臓での UGT 活性は、胎仔・乳幼仔期ではとても低く、BPA と同じように、出生後に増加する (図 3)。このことから、BPF は BPA の様に、主に UGT2B1 で代謝されていると考えられる。いくつかの報告において、BPF はヒト肝臓の株化細胞である HepG2 において、BPF-グルクロン酸抱合体 (BPF-GA) や BPF-硫酸抱合体 (BPF-S) に代謝されることが認められている[3, 9]。また、BPF を妊娠ラットに経口的に投与すると、胎盤を通過して胎仔に達することが報告されている[2]。また、BPA において動物[8, 45]やヒト[10]両方において、胎仔・羊水中で BPA、BPA-GA が検出されており、胎盤を通過することが示唆されている。当研究室でも BPA-GA 子宮灌流実験によって BPA-GA が胎仔へ移行することが示され、胎仔・羊水において BPA-GA と脱抱合された BPA が検出された[37]。これらの報告から、BPA 類似物の次世代影響を評価する際に、胎盤通過の評価とともに、胎仔・乳幼仔期の薬物動態の評価も重要になることを示している。

周産期における母親の UGT2B1、UGT1A6 の遺伝子発現量が産後 7 日で一時的に仔よりも低い

値を示したが、UGT 活性を比較しても産後大きな変化は認められないことから、産後の母親の遺伝子発現量変化は大きなものではないと考える。

本章では、BPAF に対する胎仔・乳幼仔・母体における UGT 活性は、BPA や BPF に比べて大変低いことを明らかにした。また、BPF の UGT 活性は、BPA と同じように胎仔・乳幼仔期では低いことを示した。BPA 類似物の次世代影響機序を解明するために、母体から胎仔への移行および、胎仔・乳幼仔期での薬物動態についてさらなる研究が必要である。

## 5. 小括

本章において、以下の事が明らかになった。

1) 胎仔、乳幼仔、母マウスの肝臓を用いた BPA、BPF、BPAF に対する UGT 活性を測定し、BPAF に対する UGT 活性は BPA や BPF に比べて大変低かった。BPF、BPA に対する UGT 活性は、胎児期や 7 日齢までは母親と比較すると大変低く、14 日齢あるいは 21 日齢には母親と同じレベルにまで増加する。

2) *UGT2B1*、*UGT1A6* の定量的 RT-PCR による遺伝子発現量の比較では、胎仔、新生仔の *UGT2B1* の発現量は母親と比較すると大変低く、7 日齢になると母親と同じレベルに増加し、*UGT1A6* の遺伝子発現量は 3 日齢からはほぼ母親と同レベルの発現量となった。

以上の結果から、BPF は BPA と同様に胎仔、乳幼仔期の代謝活性が低く、主に *UGT2B1* で代謝されると考えられる。BPAF は、胎仔、乳幼仔のみならず、母体においても BPA、BPAF と比較して代謝活性が大変低く、周産期だけでなく成体でも無視できない程の影響があるかもしれない。

## 第II章 BPFの肝臓組織における代謝動態

### 1. 序文

BPAは肝臓のUDP-glucuronosyltransferaseの分子種の一つであるUGT2B1によりグルクロン酸抱合体(BPA-GA)に代謝され[50]、オスのラット肝臓では主に胆汁中に排泄され[18]、速やかに体外へ排出される。このような高い排出機構があるにもかかわらず、妊娠期のBPA暴露は胎仔の発達に悪影響をおよぼすことや、さらにはその第二性徴の発達にまで影響をおよぼすという報告がある[15]。これはメスの妊娠期と非妊娠期およびオスの代謝システムに重要な違いがあると考えられる。メスの非妊娠期およびオスの肝臓では、BPAの代謝産物であるBPA-GAは主にmultidrug resistance-associated protein (MRP) 2を介して胆汁中に排出される[17]。しかしながら妊娠期にはMRP2の発現が減少し[5]、胆汁中へのBPA-GAの排出が減少し、代償として静脈中への排出が増加する[17]。BPA-GAは生物学的に不活性な代謝産物であるが、BPA-GAの母親の静脈中濃度上昇は、BPA-GAの胎盤通過のリスクを高めることになる。そしてさらにはBPA-GAはわずかではあるが、胎盤を通過し胎仔へ移行することがわかっている[37]。

近年BPAの胎児・乳幼児期における暴露に対して規制が強くなっており、BPFやBPAFなどのBPA類似物質の使用が増加している。特にBPFはヒトおよびラットの肝臓において、UGTを介して代謝され、妊娠後期の胎盤を通過することが認められている[2]。

本研究では妊娠期において、肝臓で代謝されたBPFの抱合体が、BPAと同様に胆汁中への排出が減少し、静脈中への排出が増加することで胎仔へのBPF暴露のリスクが大きくなるのではないかと仮説をたてた。妊娠期のBPFの影響を解明するために、妊娠期と非妊娠期におけるラット肝臓でのBPFの抱合と排出について検証した。

### 2. 材料と方法

#### 1) 試薬

BPA、BPFおよびHPLC適合規格のメタノールは関東化学より購入した。その他一般試薬は、純度の高い物を用いた。

#### 2) 共試動物

9～11週齢のオスおよび非妊娠期メス、妊娠期(20～21週)メスSprague-Dawley rats (SDラット)と、10週齢Eisai hyperbilirubinemic rats (EHBR)を三協ラボサービスより購入した。いずれも自由採食、自由採水とし室温22℃±2℃、12時間明-12時間暗サイクルの条件下で個別に飼育した。全ての動物実験はペントバルビタール(ソムノペンチル、共立製薬)による麻酔下で実施し、酪農学園大学動物実験委員会から承認を受けて行なった(ES23A06)。

### 3) 肝灌流

肝灌流の外科手順は第 I 章に示した通りである。流速は 3ml/min とし、5 分間の予備灌流の後 10 $\mu$ M の BPF 基質液を 5 分間灌流し、その後再び灌流液を 55 分間灌流した（灌流時間；計 60 分間）。基質灌流開始時から 60 分まで 5 分毎に胆汁・後大静脈からそれぞれ灌流液を 1ml ずつ回収した。

### 4) 肝灌流回収液の HPLC 解析

肝灌流実験の灌流液は 9000 $\mu$ g、3 分遠心を行い、上清を使用した。胆汁・後大静脈からの検体は蒸留水で 200 倍に希釈した。上清と胆汁・後大静脈からの検体は HPLC 解析まで -80 $^{\circ}$ C で保存した。HPLC 解析条件は第 I 章に示した通りである。

## 3. 結果

### 1) BPF の肝臓における抱合と排出

オスのラットの BPF 肝灌流において、BPF-GA と BPF グルクロン酸・硫酸抱合体 (BPF-GAS) が胆汁と静脈中から検出された (図 5B、C)。基質である BPF は胆汁中にほとんど検出されなかった (図 5B)。

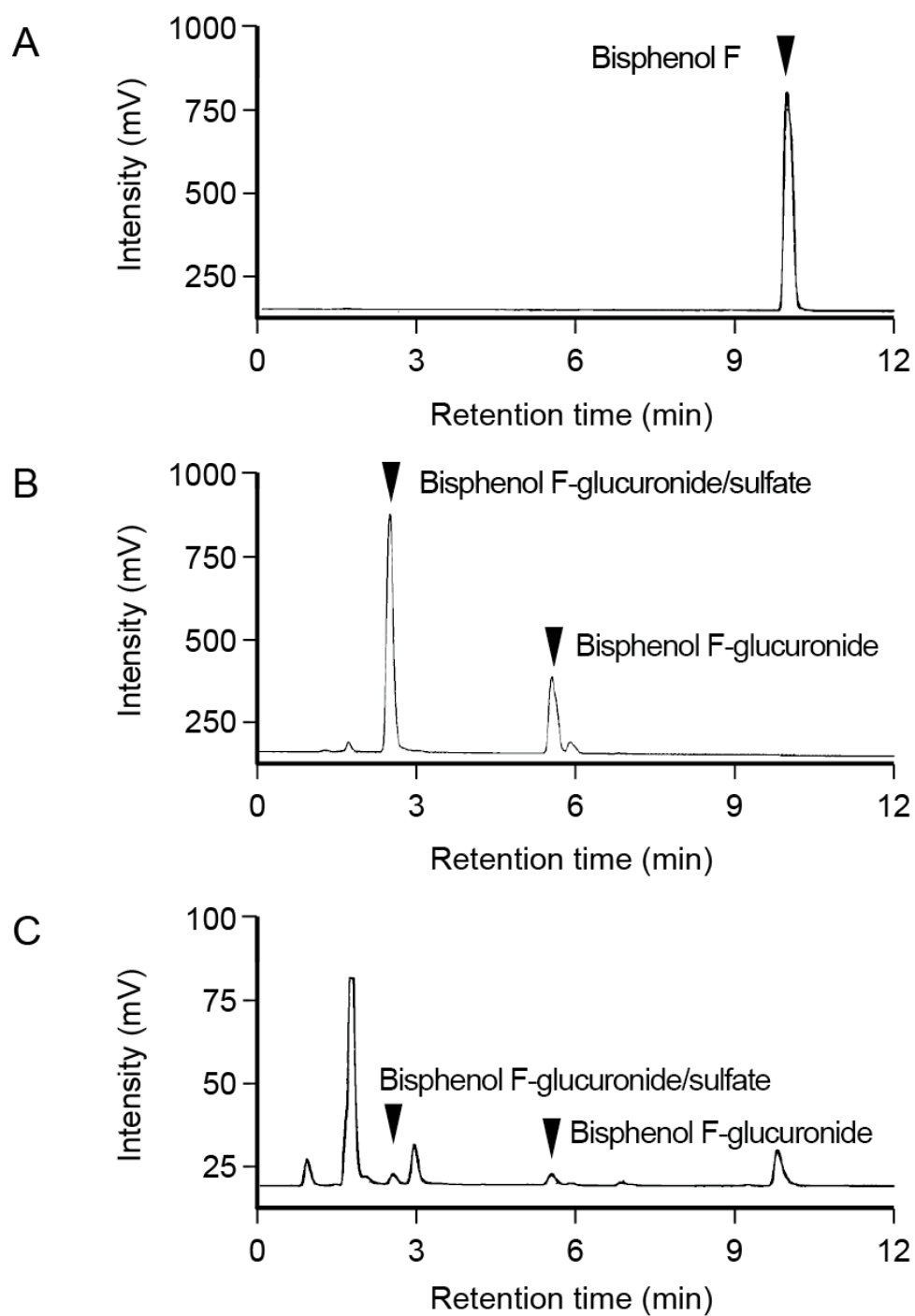


図5 肝灌流 HPLC 解析

BPF(10 $\mu$ M)を添加した灌流液 (A) および、胆汁 (B)・静脈 (C) からの回収液中の BPF-GA、BPF-GAS。

2) オス・非妊娠期メス・妊娠期メスのラットにおける BPF のグルクロン酸抱合と排出

基質である BPF は 90%以上が肝臓に吸収された。吸収された BPF のうちオスでは 12.8%が BPF-GA に、44.2%が BPF-GAS に抱合され、それぞれ 10 分・20 分をピークに主に胆汁中に排出された (図 6A)。非妊娠期のメスでは 46.9%が BPF-GA に、14.2%が BPF-GAS に抱合され、それぞれ 10 分・25 分をピークに主に胆汁中に排出された (図 6B)。非妊娠期のメスではオスでほとんど見られなかった、BPF-GA の静脈中への排出が認められた (図 6B)。1 時間の灌流後、肝臓から胆汁中や静脈中に排出された抱合体のうち、オスでは BPF-GAS が高く (抱合体の 77.5%)、メスでは BPF-GA が高かった (抱合体の 76.8%) (図 7)。妊娠期のラットでは抱合体の胆汁中への排出が減少し、静脈中への排出が増加した (図 7)。特にオスや非妊娠期のメスではほとんど見られなかった、静脈中への BPF-GAS の排出が認められた。

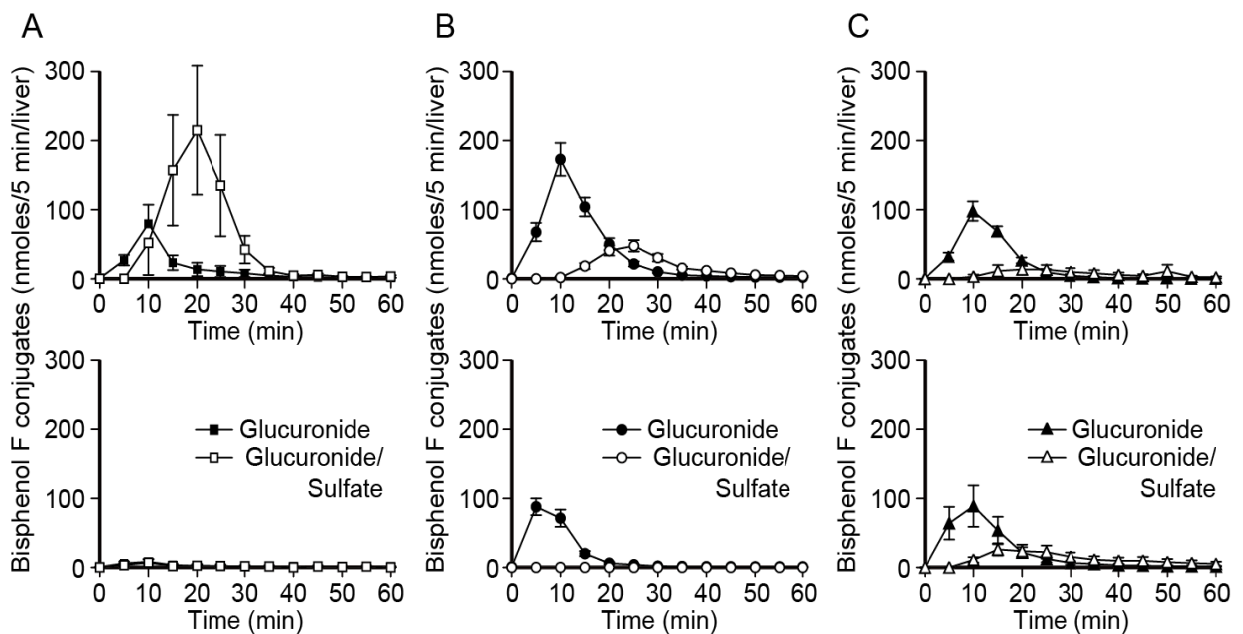


図 6 オスおよび非妊娠期メス、妊娠期メスの肝灌流実験

BPF (10 $\mu$ M) をラットオス (A)、非妊娠期メス (B)、妊娠期メス (C) において肝灌流実験を行った。BPF の抱合体である BPF-GA (●—●)、BPA-GAS (—○—) が胆汁中 (上段)、静脈中 (下段) に検出された。値は mean  $\pm$  S.E. で示した。(n=4)

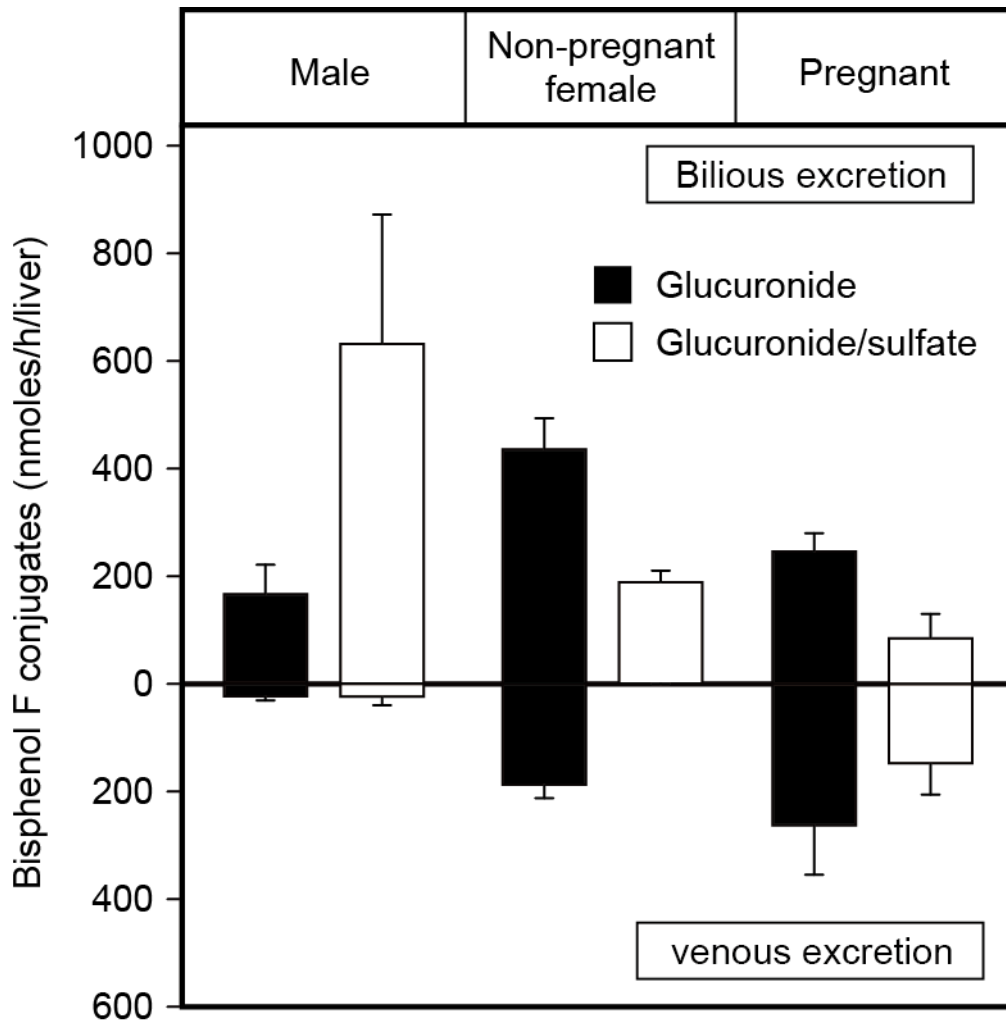


図7 肝灌流実験の回収液

オス (A)、非妊娠期メス (B)、妊娠期メス (C) において肝灌流実験を1時間行った際の胆汁 (上方)・静脈 (下方) からの回収液中の BPF-GA 量 (黒色) と、BPF-GAS 量 (白色)。値は mean ± S.E. で示した。(n=4)

### 3) EHBR における BPF の肝臓排出

肝臓組織から胆汁中への BPF-GA と BPF-GAS の排出経路を検証するために、MRP2 の欠損しているオスの EHBR を用いて肝灌流実験を行った。EHBR において、49.5%が BPF-GA に、6.7%が BPF-GAS に抱合され、5分をピークに主に静脈中に排出された (図8、9)。これは BPF-GA、BPF-GAS の胆汁排出は MRP2 を介していることを示している。



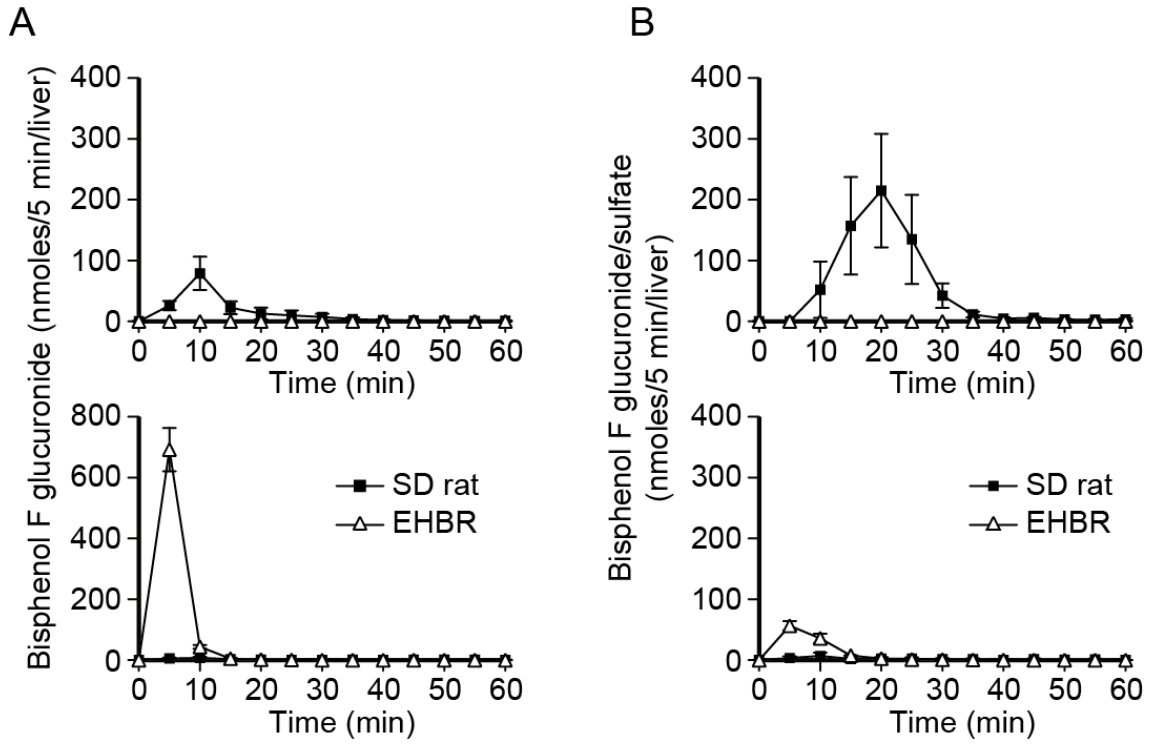


図8 EHBR における肝灌流実験

SD ラット ( ■ ), EHBR ( ▲ ) において BPF (10 $\mu$ M) の肝灌流実験を行った。BPF の抱合体である BPF-GA (A)、BPA-GAS (B) が胆汁中 (上段)、静脈中 (下段) に検出された。値は mean  $\pm$  S.E. で示した。(n=4)

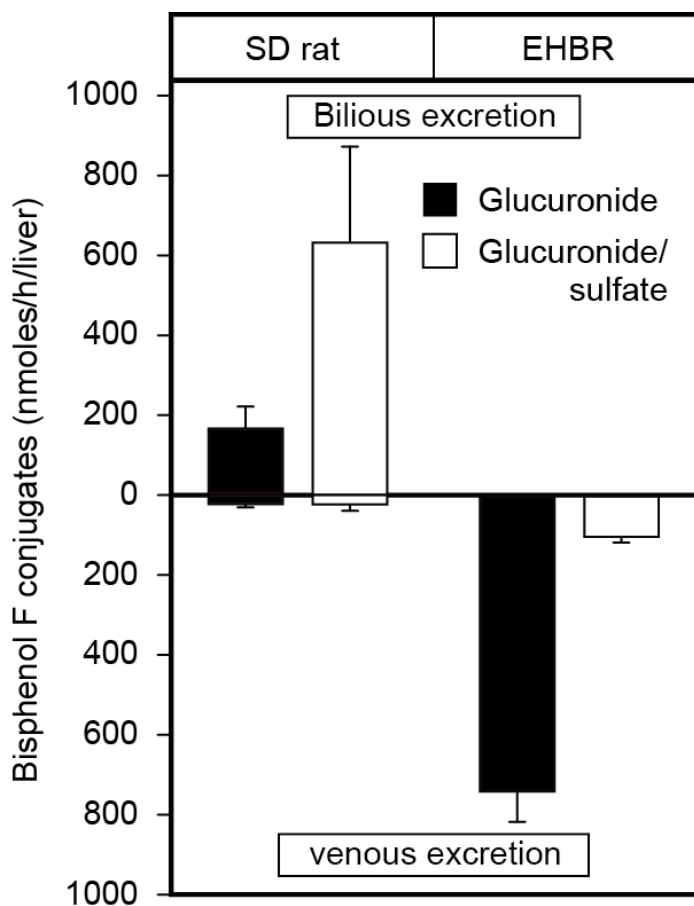


図9 EHBRにおける肝灌流実験の回収液

SDラット、EHBRにおいて肝灌流実験を1時間行った際の胆汁（上方）・静脈（下方）からの回収液中のBPF-GA量（黒色）と、BPF-GAS量（白色）。値はmean ± S.E.で示した。(n=4)

#### 4. 考察

BPFはHepG2やヒト肝臓分離細胞において、主にBPF-SやBPF-GAに代謝される[4,9]。in vivoにおいて、妊娠期ラットのBPFの経口暴露では尿中に主に硫酸抱合体が検出されている[2]。本研究では肝臓に基質を灌流させる方法で行ったが、この方法は限りなく生体に近い状態で基質の動態を検証することを可能にする方法である。ラットの肝臓でこれまで報告されていたように、BPFはBPF-GAおよびBPF-GASに代謝された。しかしながら本研究において、興味深いことに、BPFの肝臓における代謝に性差が認められた。オスの肝臓において、BPF-GAS(77.9%)が主要な代謝物であるが、非妊娠期メスの肝臓においてはBPF-GA(76.8%)が主要な代謝物であった。また、継時的な抱合体の排出ピークをみると、グルクロン酸抱合の後に硫酸抱合がなされている可能性が示唆された。BPAでは、ラットの分離肝細胞において、オスで主にBPA-GAS(70%)に代謝され、メスでは主にBPA-GA(86%)に代謝される[41]。一方、ヒトの分離細胞ではオス、

メス共に BPA-GA が主要な代謝物である[41]。オスのラットにおいて、BPF をグルクロン酸抱合した後に、BPF-GA を BPF-GAS に抱合するスルホトランスフェラーゼの活性が高い可能性が考えられる。これは種特異的なものであり、ヒトのオスの肝臓における機構とは異なるものかもしれない。ヒトとラットのオスの肝臓におけるさらなる代謝機構の比較が必要である。

オスと非妊娠期のメスラットにおいて、抱合体は主に胆汁中に排出されたが、妊娠期のメスラットでは胆汁中への排出が減少し、代償的に静脈中への排出が増加した。特に、非妊娠期メスではほとんど検出されなかった BPA-GAS が静脈中に排出された。妊娠期のラットにおいて、グルクロン酸抱合体の胆汁中への排出が減少するというのは、BPA の代謝に似ている[17]。これは化学物質のグルクロン酸抱合体の輸送に関わっている MRP ファミリーが妊娠期に減少することによると考えられる[5]。本研究の EHBR の肝灌流実験において、抱合体の胆汁中への排出が減少し、代償的に静脈中への排出が増加したということは、BPF-GA と BPF-GAS の両抱合体の胆汁中への排出は MRP2 を介在していることを示唆する。MRP2 の欠損した EHBR では、肝臓において MRP3 の発現が誘導されるという報告がある[1, 14]。このことから、MRP3 も BPF の抱合体の胆汁中への排出に関与していると考えられ、HepG2 細胞株において BPA が MRP2 や MRP3 の発現を誘導しているということにも関係する[12]。また SD ラットオスでは、BPF は主に BPF-GAS に抱合されたのに対し、EHBR では同じオスであるにも関わらず、主に BPF-GA に抱合された。継時的な抱合体の排出ピークをみると BPF-GA、BPF-GAS とともに SD ラットオス・メスよりも早い傾向があると言える。MRP2 が欠損していることで、代償的に静脈側にグルクロン酸抱合体に親和性の高いトランスポーターが発現していることが示唆されたが、これに関わる報告はほとんどないため、今後の検証が待たれる。

妊娠期における母体循環中の化学物質の抱合体の増加は、胎児暴露のリスクを高める。特に硫酸抱合体の増加は懸念されるポイントである。母体の血清中のエストロジェンは妊娠の経過と共に上昇する[24]。胎盤は母体へのエストロジェンの主な供給源であるが、17 $\alpha$ -hydroxylase/17-20-lyase や CYP17 が欠損しているためにコレステロールからエストロジェンを合成することはできない。そのため胎盤では、C-19 ステロイドの硫酸抱合体である dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) や 16 $\alpha$ -hydroxy DHEA-S (16 $\alpha$ -OH-DHEA-S) を前駆物質として、積極的に汲み込んでいる。さらに胎盤では DHEA-S や 16 $\alpha$ -OH-DHEA-S をスルファターゼにより脱抱合して、エストラジオールやエストロンを合成している。化学物質の硫酸抱合体の母体血中の増加は、この輸送系により胎盤に汲み込まれ、脱抱合されて胎仔側へ移行してしまう危険性が高いと言える。BPF の母体血中の硫酸抱合体増加は、グルクロン酸抱合体が主である BPA よりも胎児暴露のリスクが高い可能性がある。BPF は妊娠ラットにおける経口投与実験で、胎盤・羊水・胎仔に移行していることが確認されており[2]、今後、BPF の硫酸抱合体が胎盤をどのように通過するかを検証する必要がある。

また、第 I 章で胎仔・乳幼仔期において BPF に対する UGT 活性が低いことを示したが、胎仔・乳幼仔期における BPA 類似物質に対するスルホトランスフェラーゼ活性は不明なままである。胎盤における  $16\alpha$ -OH-DHEA-S の主な供給源は胎仔副腎であると言われており、胎仔副腎は妊娠 12 週以降に急速に発達し、体重比にして成人の約 20 倍に達すると言われる。胎仔副腎でのスルホトランスフェラーゼ活性は高く、DHEA の大部分を硫酸抱合している。今後、胎仔における BPA および BPA 類似物質に対する硫酸抱合活性評価が胎仔毒性評価に必要となってくると考える。

## 5. 小括

本章において、以下の事が明らかとなった。

- 1) ラットオス、非妊娠期メス、妊娠期メスにおいて、BPF の肝灌流実験を行った。BPF は BPF-GA、BPF-GAS に代謝され、オスで主に BPF-GAS が胆汁中に、非妊娠期のメスで主に BPF-GA が胆汁中に排出された。妊娠期のメスでは胆汁中の排出が減少し、代償的に静脈中への排出が増加し、特に非妊娠期にはほとんど見られなかった BPF-GAS の静脈排出が認められた。
- 2) MRP2 欠損マウスである EHBR オスにおける BPF 肝灌流実験において、BPF 抱合体の胆汁排出がほとんど見られず、静脈排出が主であった。以上の結果より、BPF-GA と BPF-GAS の両抱合体の胆汁中への排出は MRP2 を介在していることを示唆された。また妊娠期に静脈中への硫酸抱合体排出が増加する BPF はグルクロン酸抱合体が抱合体の中心となる BPA よりも胎盤通過のリスクが高い可能性が示唆された。

### 第三章 胎仔腸管での脱抱合

#### 1. 序文

BPA は生体に取り込まれると、肝臓の UGT-2B1 によってグルクロン酸抱合され[50]、MRP2 を介して胆汁中に汲み出され、速やかに体外へ排出される[17]。しかしながら、妊娠期のメスの肝臓では MRP2 の発現が減少し、静脈中の BPA-GA 濃度が高まり[17]、BPA-GA は胎盤を通過してしまう[37]。さらに胎盤を通過した BPA-GA は脱抱合された BPA として検出されており[37]、胎仔組織で脱抱合される可能性が高いことを示している。第 I 章で示したように、胎仔における薬物代謝システムは大変脆弱であるために、わずかでも BPA-GA が胎盤を通過し、ひとたび BPA へ脱抱合されると胎仔における影響は大きいと考えられる。

それでは、胎盤を通過した BPA-GA は胎仔内のどこで脱抱合されているのだろうか。ヒト胎児の各臓器における  $\beta$ -グルクロナターゼ活性の比較では、肝臓に続き、腸管での活性が高いことが示されている[20]。これは胎児のビリルビン動態に関係しており、新生児や胎児では腸管内での  $\beta$ -グルクロナターゼ活性が高く、脱抱合され腸肝循環しやすいと言われている[20]。胎児では成人よりも多血状態であり、赤血球の寿命が短いことから、ビリルビン生成が多く行われている。肝臓で抱合されたビリルビンが胆管から胎児小腸へ移行するが、腸管で  $\beta$ -グルクロナターゼによって非抱合型のビリルビンへ脱抱合され、腸管から再び胎児循環へ再吸収され、胎盤を経由して母体側へ移行し、母体肝臓により抱合されて、体外へ排出される。これは胎児が高ビリルビン血漿にならないために重要な機構である。また、Kurebayashi らの放射性標識 BPA を妊娠ラットに経口投与した実験において、胎仔の腸管と膀胱で放射性標識 BPA が検出されている[25]。胎盤を通過した BPA-GA は胎児循環から尿中、つまり羊水中に排泄されることが考えられる。ヒトの胎児尿は妊娠 12 週頃から産生が始まり、妊娠後期の羊水の主な産生源は胎児の尿である。妊娠 4 ヶ月頃から羊水の中に含まれる胎児尿の割合が急激に増大し、妊娠末期には 1 日あたり 800~1200mL にも達する。また、胎児が嚥下する羊水量は妊娠週数とともに増加するとされ、妊娠後期には 1 日に 500~1000mL に達し、これは新生児の哺乳量に匹敵する。この羊水嚥下は胎児の消化管発達を促すとされる。ヒト胎児の小腸では妊娠 11 週ごろに蠕動運動が認められ、妊娠 16 週ごろには嚥下した羊水から水分を吸収して残りを下部結腸まで運ぶことができる。vom Saal らのアカゲザルを用いた母体への BPA 経口投与実験によると、母体投与後 1 時間で羊水中に抱合型の BPA が検出されている[48]。本研究では、胎盤を通過した BPA-GA が胎児の羊水嚥下によって胎児腸管に流入し、胎児腸管の高い脱抱合機構により、BPA-GA が BPA へ脱抱合されているのではないかと仮説をたてた。

私達はターゲット臓器を使った灌流により様々な内分泌かく乱物質の動態を研究しており、この技術は生体に近い状態で物質の動態を検証すること可能にする。本研究では BPA および

BPA-GA を基質としてラット胎仔腸管へ灌流させることで、生体に近い状態で、胎仔腸組織での BPA および BPA-GA の取り込み・代謝（変換）・漿膜側への汲み出しについて検証を行った。

## 2. 材料と方法

### 1) 試薬

BPA および HPLC 適合規格のメタノールは関東化学より購入した。

### 2) 共試動物

妊娠 SD ラット（10 週齢、妊娠 17.5 日齢）は三協ラボサービスより購入した。いずれも自由採食、自由採水とし室温  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、12 時間明 - 12 時間暗サイクルの条件下で個別に飼育した。全ての動物実験は酪農学園大学動物実験委員会から承認を受けて行なった（ES21A03）。

### 3) ビスフェノール類のグルクロン酸抱合体の分離・精製

BPA-GA の精製は第 I 章に示した通り。

### 4) 胎仔腸管灌流

母体（妊娠 20 日齢）、胎仔はペントバルビタール（ソムノペンチル、共立製薬）による麻酔下で後大静脈を切断することで安楽死を行った。安楽死後、胎仔腸管は空腸、回腸、盲腸、大腸を含んだ状態で摘出して、胃から 5cm のところで切断した。クレブス・リンガーバッファー（115 mM NaCl、5.9 mM KCl、1.2 mM MgCl<sub>2</sub>、1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.2 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、2.5 mM CaCl<sub>2</sub>、25 mM NaHCO<sub>3</sub>、10 mM グルコース）を漿膜・粘膜溶液として使用した。バッファーは 95%O<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub> でエアレーションを行い、pH7.4 に調節した。胎仔腸管灌流のシステムは図 10 に示した。胎仔腸管は頭側から 27 ゲージの針を挿入し、漿膜溶液の入っているポリエチレンのチャンバーに固定した。粘膜溶液は 2 $\mu$ M の BPA または BPA-GA を添加し、頭側から 10 分間、3mL/h で灌流した。尾側の腸管からの流出液は、灌流開始 5 分後から 10 分後までを回収した。灌流後、腸管と漿膜溶液を回収し、解析まで -80 $^{\circ}$ C に保管した。

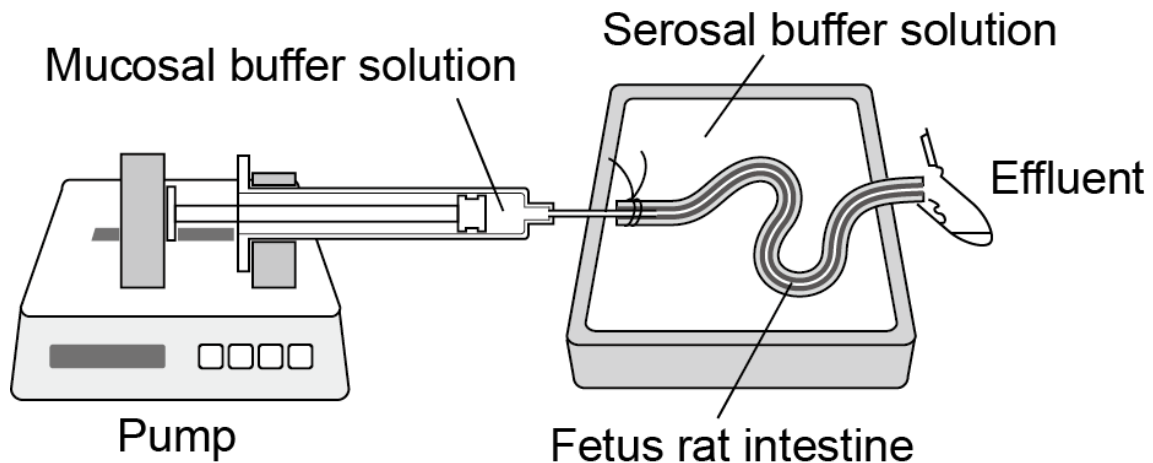


図 10 胎仔腸管灌流概略図

#### 5) 胎仔腸管および灌流回収液の HPLC 解析

胎仔腸管は、0.1mM EDTA を添加した 4 倍量の 0.1M リン酸バッファー (pH7.4) に入れ、ホモジネートし、その後 5 分間超音波処理を行った。これに等量のアセトニトリルを加え、4°C で 10,000xg、10 分遠心を行い、上清を使用した。粘膜・漿膜液からの回収液はフィルター (HLC-DISK3、関東化学) をろ過し、上清を使用した。HPLC 解析条件は第 I 章に示した通りである。

#### 6) 免疫組織染色

胎仔の胃および腸管切片を用いて免疫組織染色を行った。妊娠 20 日齢の SD ラットおよび 18 日齢のマウスから胎仔を取り出し、胎仔の胃および腸管を採取し、4%パラホルムアルデヒド/PBS (pH7.0) に 4°C で一晩浸漬して固定した。25%、50%、70%、99%、100%のエタノールに順次 2 時間ずつ振盪浸漬して脱水した後、キシレンに浸漬してパラフィン包埋を行った。マイクロームで 7 $\mu$ m 厚の切片を作成し、スライドガラスに伸展、貼付した。キシレンによって脱パラフィン処理を行った後再水和処理を行い、10mM のクエン酸バッファーに浸漬して 15 分間加熱した。室温まで冷却後、3% $H_2O_2$  加メタノールに 10 分間浸し、PBS で 3 分間 3 回洗浄した。PBS で希釈した 10%正常ヤギ血清 (NGS) を切片にマウントし、室温で 1 時間インキュベートしブロッキングを行った。10%NGS で 100 倍希釈した抗  $\beta$ -グルクロニターゼ抗体をマウントし、4°C で一晩インキュベートした。陰性対照には 10%NGS を用いた。0.05% Tween 20 添加 PBS で 3 回洗浄した後、シンプルステインマウス MAX-PO (ニチレイ、東京) を添加し室温に 30 分間静置し、その後 0.05% Tween 20 添加 PBS で 3 回洗浄した。発色には、シンプルステイン DAB 溶液 (ニチレイ) を用い、顕微鏡下で観察した。

### 3. 結果

#### 1) 胎仔腸管灌流

BPA-GA の脱抱合や移送を明らかにするために、BPA または BPA-GA を基質としてラット胎仔腸管を用いた灌流実験を行った。まず、BPA を基質として腸管に灌流させたところ、腸組織に BPA-GA、そして基底膜側に BPA が検出された (図 11B)。このことは BPA が抱合され、BPA-GA に変換されること、そして脂溶性の BPA が腸管から腸組織を通過し、基底膜側に移送されることを示している。

次に BPA-GA を基質として腸管に灌流させると、腸組織、基底膜側から BPA が検出された (図 11A)。このことは腸管を流れた BPA-GA が小腸で BPA に変換され、脱抱合された BPA が基底膜側に移送されることを示している。



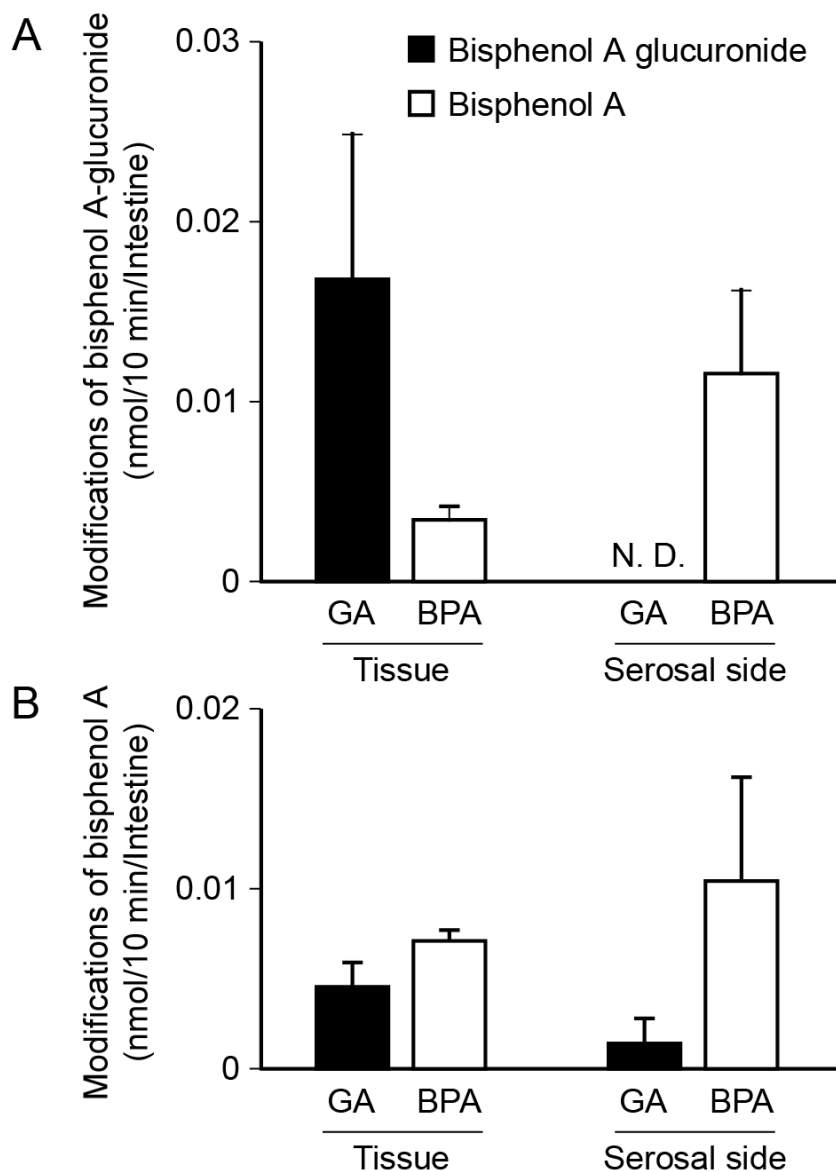


図 11 ラット胎仔腸管を用いた灌流実験

BPA-GA (A)、BPA (B) を基質として灌流させ、腸管組織、漿膜緩衝液を回収し、それぞれ BPA-GA (黒)、BPA (白) を検出した。値は mean ± S.E. で示した。(A:n=12、B:n=8)

## 2) β-グルクロニターゼの局在

胃、小腸における β-グルクロニターゼの局在を免疫染色によって調べた。β-グルクロニターゼは抱合体を脱抱合体にする酵素としてよく知られている。粘膜上皮の細胞質に β-グルクロニターゼが局在していることがわかった (図 12)。また、β-グルクロニターゼは小腸で発現が高く、胃、結腸では発現が低かった。

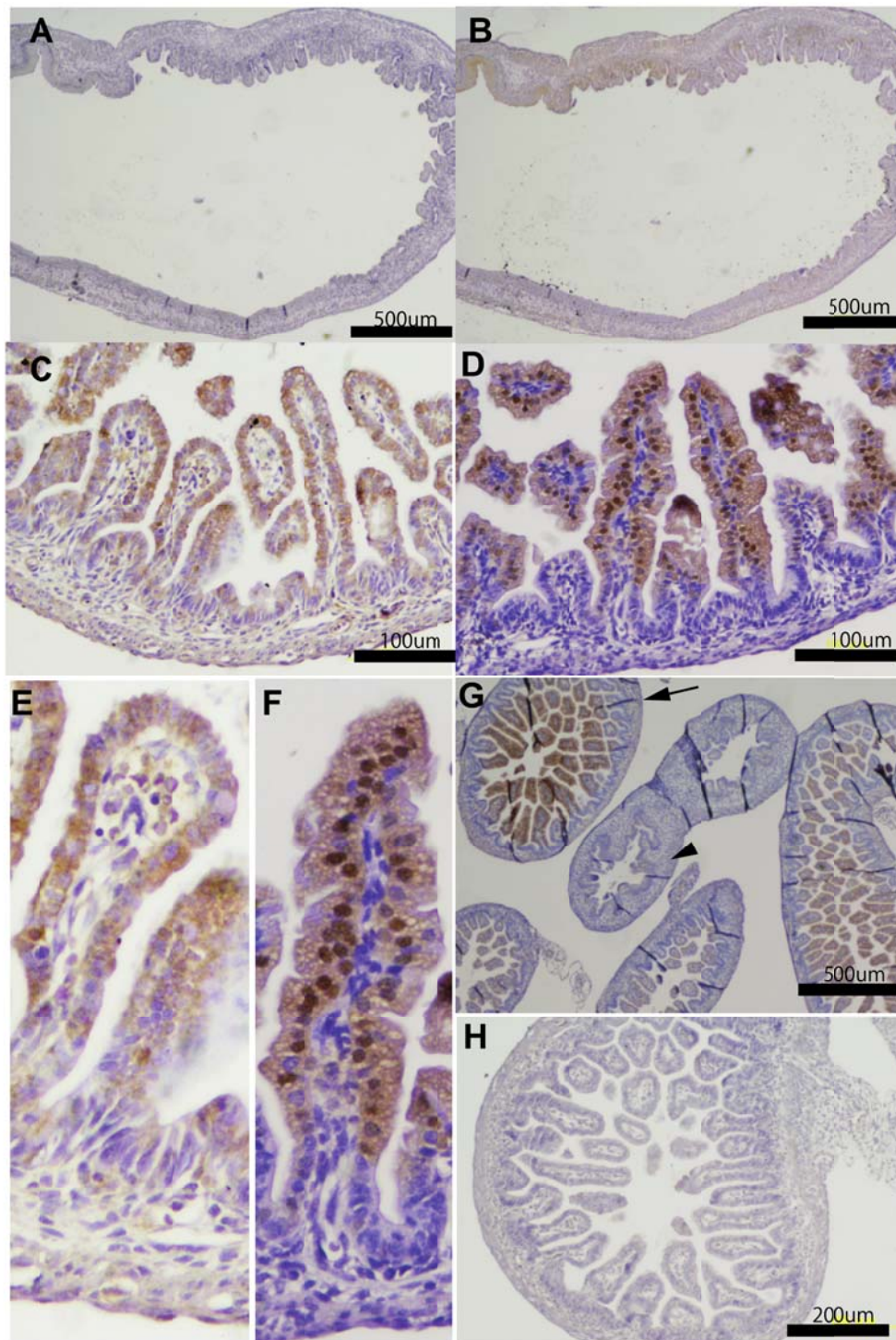


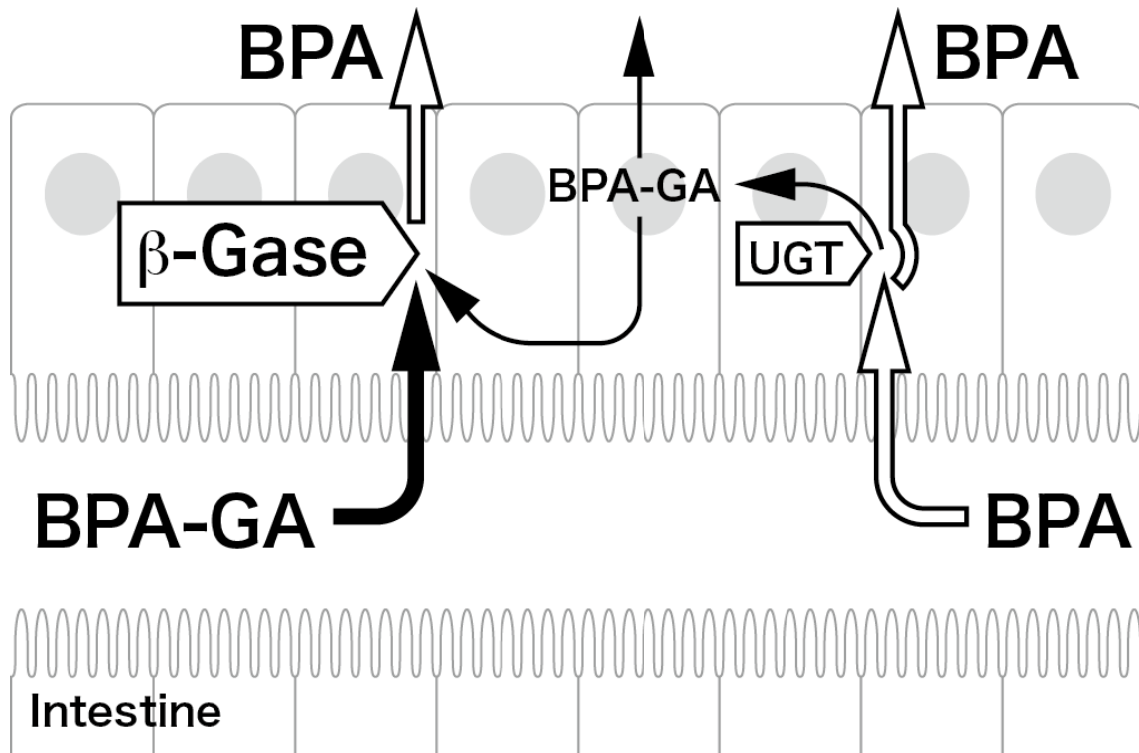
図 12 ラット胎仔胃および腸管の免疫組織染色

20 日齢のラット胎仔胃および腸管において、 $\beta$ -グルクロニターゼの免疫組織染色を行った。A、B：ラット胎仔胃（B は抗  $\beta$ -グルクロニターゼ抗体(-)）、C、E：ラット胎仔腸、D、F、G、H：マウス胎仔腸管（H は抗  $\beta$ -グルクロニターゼ抗体(-)）。矢印は、小腸を示し、矢頭は、結腸を示す。

#### 4. 考察

BPA の胎盤通過や胎児毒性に関する報告は数多くあるものの、胎盤を通過してから毒性発現に至るまでの詳細な動態は未だ不明なままである。本研究ではその一助となるべく、胎盤を通過した BPA-GA の胎仔における脱胞合を検証した。Muna S. Nahar ほかによると、ヒト胎児肝臓から非抱合型および抱合型 BPA が検出されている [36]。胎児循環において、胎児血は臍帯静脈から約半分は肝臓に入り、残り半分は静脈管を経て下大静脈に入る。母体血流から胎盤を通過した BPA-GA の約半分が肝臓に流入し、肝臓の  $\beta$ -グルクロニターゼによって脱胞合されている可能性が考えられる。残りの BPA-GA、あるいは肝臓で脱胞合されなかった BPA-GA は胎児循環から尿中に排出され、胎児の羊水嚥下によって胎児腸管に流入すると考えられる。そして本研究の胎仔腸管の灌流実験により明らかになったように、腸管内に流入した BPA-GA は、粘膜上皮細胞内、あるいは粘膜上皮細胞から放出された  $\beta$ -グルクロニターゼにより腸管腔内で BPA に脱胞合され、さらに基底膜側に移送される (図 13)。

胎児は成人に比べ多血傾向であり、赤血球の寿命が 70~90 日と短い (成人 100~120 日) ため、ビリルビンの生成が盛んであり、その排泄に  $\beta$ -グルクロニターゼによる脱胞合は重要である。しかし、そもそも抱合能が未熟である胎児において、肝臓・腸管での脱胞合活性が高いことにはどのような意味があるのだろうか。非抱合型ビリルビンは胎児側から胎盤を介して単純拡散に加え ATP 依存的に積極的に母体側に汲み出されている [43] が、血清中の非抱合型ビリルビン濃度は、胎児において母体よりも高く維持されている [35, 22]。Perez MJ ほかの報告によると、胎児において非抱合型ビリルビン濃度が母体側よりもある程度高いことが、妊娠後期に起こるとされる母体の肝障害による胆汁うっ滞による酸化ストレスから胎児をまもることになるという [40]。第 II 章で述べたように胎児側での硫酸抱合は活発であるが、グルクロン酸抱合は脱胞合が優位になっているのである。グルクロン酸抱合体の胎盤通過は、硫酸抱合体の胎盤通過よりもわずかであるかもしれないが、一度胎盤を通過すると容易に脱胞合されやすいと考えられる。また、第 I 章で示したように、胎仔における UGT2B1 の発現量は低く、代謝能が大変低いために、BPA として蓄積し影響を与えていると考えられる。脱胞合された BPA の胎児内の動態や毒性発現機序について、さらなる検討が必要である。



▬ Bisphenol A      ■ Bisphenol A glucuronide

▭ UGT UDP-glucuronosyltransferase

▭  $\beta$ -Gase Beta-glucuronidase

図 13 胎仔腸管内での BPA および BPA-GA の動態

胎仔腸管内に BPA-GA が流入すると、腸管腔内あるいは粘膜上皮内の  $\beta$ -グルクロニターゼにより BPA へ脱抱合される。脱抱合された BPA の一部は BPA-GA に抱合されるが、多くは BPA として漿膜側に汲み出される。

## 5. 小括

本章において、以下の事が明らかとなった。

ラット胎仔における BPA-GA および BPA の腸管灌流実験および  $\beta$ -グルクロニターゼの免疫組織染色を行った。BPA-GA を腸管に灌流させると、腸組織、基底膜側から BPA が検出された。BPA-GA が小腸で BPA に変換され、さらに基底膜側に移送されること示した。  $\beta$ -グルクロニターゼは粘膜上皮の細胞質に局在していることが分かった。

以上の結果より、胎盤を通過した BPA-GA は胎仔循環から羊水中へ尿として排泄され、胎仔の羊水飲水によって腸管に流入し、胎仔腸管の  $\beta$ -グルクロニターゼによって BPA に活性化されて影響を及ぼしていることが示唆された。

## 総括

本研究では妊娠期における BPA 類似物暴露による次世代影響の一端を解明することを目的として、BPA 類似物の胎仔、乳幼仔における代謝能および、妊娠期における代謝動態について比較検証を行い、さらに胎仔における BPA の抱合体の再活性について検証を行った。BPA の次世代影響について数多くの報告がされる中、BPA の使用規制が世界的な流れとなり、BPA の代替物質に対する需要が高まっている。一般消費者の間でもその関心は高く、市場では『BPA-free』と表示されている商品も売られている。しかしながら、BPA の代替物質となる BPA 類似物の生体への影響はまだ十分に評価されていない。現在、様々な種類の BPA 類似物が作られており、使用規制されないままその使用は年々増加している。

BPAF は BPA に比べて、エストロゲン活性が低いとされ、BPA よりも安全な代替え物質とされているが、本研究で明らかになったように、胎仔、乳幼仔期のみならず、成体での影響も無視できない物質である可能性がある。当初、BPA 類似物はその構造が BPA とよく似ているので、BPA と同じような動態を示すと考えていたが、BPAF は母親の肝臓での代謝活性も BPA と比較して低いことが明らかとなった。BPAF は成体において体外への排出が遅く蓄積する可能性があり、活性型のまま影響を与えていることが示唆された。

BPF は BPA と同じように、胎仔・乳幼仔期の代謝能は未発達であることが明らかとなった。さらに妊娠期において肝臓での抱合体の胆汁排出が減少し、特に硫酸抱合体の静脈排出が増加することが明らかとなった。母体血中の硫酸抱合体が増加する BPF は、グルクロン酸抱合体が主である BPA よりも胎仔暴露のリスクが高い可能性が示唆された。

また、胎盤を通過する BPA の抱合体である BPA-GA が胎仔腸管で脱抱合されることを明らかにした。胎児において、硫酸抱合は活発であるが、グルクロン酸抱合は脱抱合が優位となる。これは薬物などの化学物質は、母親において速やかにグルクロン酸抱合されれば胎仔暴露のリスクは低いとする見解をゆるがしかねない。これまで安全とされてきた他の薬剤も今回検証された BPA と同じ様に、グルクロン酸抱合体の胎盤通過はわずかであっても、一度胎盤を通過すると胎仔腸管等で容易に脱抱合され、胎仔の未熟な抱合能により、活性型のまま蓄積し、影響を及ぼしている可能性がある。

BPA の代替物質の需要が高まる中で、経済産業省の生産動態統計によると BPA の日本国内の年間生産量はここ数年減少傾向にあるものの、ほぼ横ばいであり 2014 年の生産量は約 415000 t におよぶ。カナダ (2010 年) や EU (2011 年) が哺乳瓶の製造にポリカーボネートの使用を禁止し[51, 53]、フランス (2015 年) が全ての食品包装での BPA の使用を禁止した[55]一方で、米国食品医薬品庁 (FDA) は「現在の暴露レベルでの健康リスクは存在しない」(2014 年) [56]とし、欧州食品安全機関 (EFSA) は「BPA は許容値以下の使用であれば、胎仔、乳幼児を含む全

月齢に健康リスクはない」(2015年)[52]と示している。日本では、2010年のBPAの食品健康影響評価についての中間とりまとめにて「現時点における知見からはTDIを設定することは困難であるが、今後低用量影響に関する新たな科学的知見が得られた時点で、再度TDIについて検討する」[54]という立場にとどまっている。このように各国の対応に差がみられるのは、BPAの低用量暴露での影響について評価が難しいこと、毒性発現機序についてまだほとんど解明されていないことが大きな要因である。また、BPAは母体において急速に代謝され、排出されるため、胎仔のBPA暴露量は無視できる程度であるという見解が根底にある。しかしながら、妊娠に伴う代謝機構の変化は今回の研究でも見られたように、肝臓からの抱合体の静脈排出を増加させ、胎盤ではエストロゲン合成のためにDHEASを積極的に胎盤に汲み込む様に、抱合体を選択的に胎盤に汲み込む機構がある。約270日の妊娠期間に母体は化学物質を抱合体に代謝し、胎盤経由で胎仔側へ排出している可能性がある。Vom Saalほかのアカゲザルを用いたBPA経口投与実験で、妊娠初期に比べ胎盤が発達する妊娠後期において、抱合型BPAの母体血中濃度の下がり方が大きく、胎仔や羊水中に抱合型BPAが検出されたこと[48]はこれを裏付けている。BPAに関する世界的な動向が二分する中、BPAの胎児毒性発現機序の詳細な解明が急務となっている。

本研究において、近年使用が増大しているBPA類似物の周産期における胎仔暴露リスクがBPAよりも高い可能性があること、また胎盤を通過するBPA-GAの胎仔内動態の一端が明らかとなった。各国では未だ不明な点の多いBPAについて、妊婦や授乳中の母親、乳児が暴露量を減らす方法として、缶詰食品を控えることや食品包装されたまま加熱しない等を挙げているが、BPAおよびBPA類似物は身近なものに大変広く使用されており、妊婦や母親だけが摂取量を制限するのは極めて難しいのが現状である。BPAとその類似物質の代謝動態や作用機序の解明は、その影響の防止や軽減につながることを期待され、本研究はその一助になればと考える。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、ご懇切なご指導、論文のご校閲をいただきました本学獣医学部 生体機能教育群 獣医生化学ユニット 横田博教授、岩野英知准教授に深く感謝いたします。

また、本論文のご校閲をいただきました本学獣医学部 生体機能教育群 獣医栄養生理学ユニット 翁長武紀教授ならびに生体機能教育群 獣医薬理学ユニット 北澤多喜雄教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、ご懇切なご指導、ご助言をいただきました日本動物特殊診断株式会社 井上博紀先生に深く感謝いたします。

また、本研究を行うにあたり多大なご協力をいただきました本学獣医生化学ユニットの皆様に深く感謝いたします。

## 引用文献

1. Akita, H., Suzuki, H. and Sugiyama, Y. 2001. Sinusoidal efflux of taurocholate is enhanced in Mrp2-deficient rat liver. *Pharmaceutical Research*. **18**: 1119-1125.
2. Cabaton, N., Chagnon, M.C., Lhuguenot, J.C. et al., 2006. Disposition and metabolic profiling of bisphenol F in pregnant and nonpregnant rats. *J. Agric. Food. Chem.* **54**: 10307-10314.
3. Cabaton, N., Dumont, C., Severin, I. et al., 2009. Genotoxic and endocrine activities of bis(hydroxyphenyl)methane (bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line. *Toxicology* **255**: 15-24.
4. Cabaton, N., Zalko, D., Rathahao, E. et al., 2008. Biotransformation of bisphenol F by human and rat liver subcellular fractions. *Toxicol. In Vitro* **22**: 1697-1704.
5. Cao, J., Stieger, B., Meier, P.J. et al., 2002. Expression of rat hepatic multidrug resistance-associated proteins and organic anion transporters in pregnancy. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. **283**: G757-766.
6. Cobellis, L., Colacurci, N., Trabucco, E. et al., 2009. Measurement of bisphenol A and bisphenol B levels in human blood sera from healthy and endometriotic women. *Biomedical chromatography : BMC*, **23**: 1186-1190.
7. De Coster, S. and van Larebeke, N. 2012. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *J. Environ. Public. Health*. **2012**: 713696.
8. Domoradzki, J.Y., Pottenger, L.H., Thornton, C.M. et al., 2003. Metabolism and pharmacokinetics of bisphenol A (BPA) and the embryo-fetal distribution of BPA and BPA-monoglucuronide in CD Sprague-Dawley rats at three gestational stages. *Toxicol. Sci.* **76**: 21-34.
9. Dumont, C., Perdu, E., de Sousa, G. et al., 2011. Bis(hydroxyphenyl)methane-bisphenol F-metabolism by the HepG2 human hepatoma cell line and cryopreserved human hepatocytes. *Drug Chem. Toxicol.* **34**: 445-453.
10. Edlow, A.G., Chen, M., Smith, N.A. et al., 2012. Fetal bisphenol A exposure: concentration of conjugated and unconjugated bisphenol A in amniotic fluid in the second and third trimesters. *Reprod. Toxicol.* **34**: 1-7.
11. Feng, Y., Yin, J., Jiao, Z. et al., 2012. Bisphenol AF may cause testosterone reduction by directly affecting testis function in adult male rats. *Toxicol. Lett.* **211**: 201-209.
12. Hanet, N., Lancon, A., Delmas, D. et al., 2008. Effects of endocrine disruptors on genes associated with 17beta-estradiol metabolism and excretion. *Steroids* **73**: 1242-1251.
13. Hashimoto, Y. and Nakamura, M. 2000. Estrogenic activity of dental materials and bisphenol-A related



- chemicals in vitro. *Dental Materials J.* **19**: 245-262.
14. Higuchi, K., Kobayashi, Y., Kuroda et al., 2004. Modulation of organic anion transporting polypeptide 1 and multidrug resistance protein 3 expression in the liver and kidney of Gunn rats. *Hepatology Res.* **29**: 60-66.
  15. Howdeshell, K.L., Hotchkiss, A.K., Thayer, K.A. et al., 1999. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* **401**: 763-764.
  16. Ikezuki, Y., Tsutsumi, O., Takai, et al., 2002. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Human Reproduction* **17**: 2839-2841.
  17. Inoue, H., Tsuruta, A., Kudo, S. et al., 2005. Bisphenol a glucuronidation and excretion in liver of pregnant and nonpregnant female rats. *Drug Metab. Dispos.* **33**: 55-59.
  18. Inoue, H., Yokota, H., Makino, T. et al., 2001. Bisphenol a glucuronide, a major metabolite in rat bile after liver perfusion. *Drug Metab. Dispos.* **29**: 1084-1087.
  19. Iyanagi, T., Watanabe, T. and Uchiyama, Y. 1989. The 3-methylcholanthrene-inducible UDP-glucuronosyltransferase deficiency in the hyperbilirubinemic rat (Gunn rat) is caused by a -1 frameshift mutation. *J. Biol. Chem.* **264**: 21302-21307.
  20. Jirsova, V., Koldovsky, O., Heringova, A. et al., 1965. Beta-glucuronidase activity in different organs of human fetuses. *Biologia neonatorum. Neo-natal studies*, **8**: 23-29.
  21. King, C.D., Rios, G.R., Assouline, J.A et al., 1999. Expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and 1A6 in the human brain and identification of 5-hydroxytryptamine as a substrate. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**: 156-162.
  22. Knudsen, A. and Lebech, M., 1989. Maternal bilirubin, cord bilirubin, and placenta function at delivery and the development of jaundice in mature newborns. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* **68**:719-724.
  23. Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F. et al., 1993. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* **132**: 2279-2286.
  24. Kuijper, E.A., Ket, J.C., Caanen, M.R. et al., 2013. Reproductive hormone concentrations in pregnancy and neonates: a systematic review. *Reproductive biomedicine online* **27**: 33-63.
  25. Kurebayashi, H., Nagatsuka, S., Nemoto, H. et al., 2005. Disposition of low doses of <sup>14</sup>C-bisphenol A in male, female, pregnant, fetal, and neonatal rats. *Archives of toxicology* **79**: 243-252.
  26. Li, M., Yang, Y., Yang, Y. et al., 2013. Biotransformation of bisphenol AF to its major glucuronide metabolite reduces estrogenic activity. *PLoS One* **8**: e83170.
  27. Li, Y., Burns, K.A., Arao, Y. et al., 2012. Differential estrogenic actions of endocrine-disrupting chemicals bisphenol A, bisphenol AF, and zearalenone through estrogen receptor alpha and beta in vitro. *Environ. Health Perspect.* **120**: 1029-1035.

28. Li, Y., Luh, C.J., Burns, K.A. et al., 2013. Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs): In Vitro Mechanism of Estrogenic Activation and Differential Effects on ER Target Genes. *Environ. Health Perspect.* **121**: 459-466.
29. Liao, C. and Kannan, K. 2013. Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure. *J. Agric. Food Chem.* **61**: 4655-4662.
30. Liao, C., Liu, F., Guo, Y. et al., 2012. Occurrence of eight bisphenol analogues in indoor dust from the United States and several Asian countries: implications for human exposure. *Environ. Sci. Technol.* **46**: 9138-9145.
31. Mackenzie, P.I., Gregory, P.A., Gardner-Stephen, D.A. et al., 2003. Regulation of UDP glucuronosyltransferase genes. *Current Drug Metab.* **4**: 249-257.
32. Mackenzie, P.I., Owens, I.S., Burchell, B. et al., 1997. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* **7**: 255-269.
33. Matsumoto, J., Yokota, H. and Yuasa, A. 2002. Developmental increases in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy. *Environ. Health Perspect.* **110**: 193-196.
34. Matsushima, A., Liu, X., Okada, H. et al., 2010. Bisphenol AF is a full agonist for the estrogen receptor ERalpha but a highly specific antagonist for ERbeta. *Environ. Health Perspect.* **118**: 1267-1272.
35. Monte, M.J., Rodriguez-Bravo, T., Macias, R.I., Bravo, P., el-Mir, M.Y., Serrano, M.A., Lopez-Salva, A. and Marin, J.J. 1995. Relationship between bile acid transplacental gradients and transport across the fetal-facing plasma membrane of the human trophoblast. *Pediatr. Res.* **38**: 156-163.
36. Nahar, M. S., Liao, C., Kannan, K. et al. 2013. Fetal liver bisphenol A concentrations and biotransformation gene expression reveal variable exposure and altered capacity for metabolism in humans. *J Biochem Mol Toxicol.* **27(2)**: 116-123.
37. Nishikawa, M., Iwano, H., Yanagisawa, R. et al., 2010. Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environ. Health Perspect.* **118**: 1196-1203.
38. Olea, N., Pulgar, R., Perez, P. et al., 1996. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect.* **104**: 298-305.
39. Peretz, J., Vrooman, L., Rieke, W.A. et al., 2014. Bisphenol a and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2007-2013. *Environ. Health Perspect.* **122**: 775-786.
40. Perez, M.J., Castano, B., Jimenez, S., Serrano, M.A., Gonzalez-Buitrago, J.M. and Marin, J.J. 2008. Role of vitamin C transporters and biliverdin reductase in the dual pro-oxidant and anti-oxidant effect of biliary compounds on the placental-fetal unit in cholestasis during pregnancy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*

- 232:327-336.
41. Pritchett, J.J., Kuester, R.K. and Sipes, I.G. 2002. Metabolism of bisphenol a in primary cultured hepatocytes from mice, rats, and humans. *Drug Metab. Dispos.* **30**: 1180-1185.
  42. Rosenmai, A.K., Dybdahl, M., Pedersen, M. et al., 2014. Are structural analogues to bisphenol a safe alternatives? *Toxicol. Sci.* **139**: 35-47.
  43. Serrano, MA., Bayon, JE., Pascolo, L., Tiribelli, C., Ostrow, JD., Gonzalez-Gallego, J. and Marin, JJ. 2002. Evidence for carrier-mediated transport of unconjugated bilirubin across plasma membrane vesicles from human placental trophoblast. *Placenta.* **23**: 527-535.
  44. Shi, J., Jiao, Z., Zheng, S. et al., 2015. Long-term effects of Bisphenol AF (BPAF) on hormonal balance and genes of hypothalamus-pituitary-gonad axis and liver of zebrafish (*Danio rerio*), and the impact on offspring. *Chemosphere*, **128**: 252-257.
  45. Sui, Y., Ai, N., Park, S.H. et al., 2012. Bisphenol A and its analogues activate human pregnane X receptor. *Environ. Health Perspect.* **120**: 399-405.
  46. Teeguarden, J.G., Calafat, A.M., Ye, X. et al., 2011. Twenty-four hour human urine and serum profiles of bisphenol a during high-dietary exposure. *Toxicol. Sci.* **123**: 48-57.
  47. vom Saal, F.S. and Hughes, C. 2005. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ. Health Perspect.* **113**: 926-933.
  48. vom Saal, F.S., Vande voort, Catherine A et al. 2014. Bisphenol A (BPA) pharmacokinetics with daily oral bolus or continuous exposure via silastic capsules in pregnant rhesus monkeys: Relevance for human exposures. *Reprod Toxicol.* **45**: 105-116.
  49. Wolstenholme, J.T., Rissman, E.F. and Connelly, J.J. 2011. The role of Bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. *Horm. Behav.* **59**: 296-305.
  50. Yokota, H., Iwano, H., Endo, M. et al., 1999. Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem. J.* **340**: 405-409.
  51. 委員会指令, 2011/8/EU, 2011.1.29. プラスチック製乳児用哺乳瓶へのビスフェノール A (BPA) の使用制限に関し指令 2002/72/EC を改正. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:026:0011:0014:EN:PDF>
  52. 欧州食品安全機関(EFSA), 2015.1.21. 食品中のビスフェノール A(BPA)の存在に関連した健康リスクに関する科学的意見書. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3978.pdf>
  53. カナダガゼット, 2010/3/31. ビスフェノール A(BPA)を含むポリカーボネート製ほ乳瓶を有害製品法のリストに追加する規則. <http://www.gazette.gc.ca/rp-pr/p2/2010/2010-03-31/html/so-r-dors53-eng.html#REF1>
  54. 食品安全委員会, 2010.7.7. ビスフェノール A(BPA)に関する健康影響について中間とりまとめ.

- <http://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kai20100707ky1&fileId=012>
55. フランス政令 No.2012-1442, 2012.12.24. :BPA を含み、食品との直接接触が意図されているあらゆる梱包、コンテナ、または調理器具の製造、輸入、輸出、販売を禁ずる. [http://www.legifrance.gouv.fr/jopdf/common/jo\\_pdf.jsp?numJO=0&dateJO=20121226&numTexte=2&pageDebut=20395&pageFin=20396](http://www.legifrance.gouv.fr/jopdf/common/jo_pdf.jsp?numJO=0&dateJO=20121226&numTexte=2&pageDebut=20395&pageFin=20396)
56. 米国食品医薬品庁(FDA), 2014.12.5. ビスフェノール A(BPA)に係る安全性評価書. <http://www.fda.gov/downloads/NewsEvents/PublicHealthFocus/UCM424266.pdf>